

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian *true experimental posttest-only control design*. Metode yang digunakan adalah dilusi tabung (mikrodilusi) untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang kunci pepet (*Kaempferia agustifolia* Rosc.) terhadap *C. albicans* secara *in vitro*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium BioMed Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, dilaksanakan pada bulan Oktober 2019.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *C. albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah jamur *C. albicans* yang diambil dengan menggunakan *simple random sampling*.

4.3.3 Besar sampel

Penelitian menggunakan 8 perlakuan dan 2 kontrol. Berdasarkan rumus replikasi Faderer (1963) dalam (Endra, 2017) maka:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(10-1)(n-1) \geq 15$$

$$9(n-1) \geq 15$$

$$n \geq (15+9) / 9$$

$$n \geq 3$$

keterangan :

t = banyaknya kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dari hasil perhitungan diatas, maka diperlukan tiga kali pengulangan untuk sampel.

4.3.4 Variabel Penelitian

4.3.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah ekstrak *Kaempferia agustifolia* Rosc. dengan menggunakan 10 kelompok konsentrasi yaitu 100% (Kontrol Bahan), 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0% (Kontrol Jamur).

4.3.4.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikatnya adalah jumlah koloni jamur *C. albicans* yang telah diberi ekstrak *Kaempferia angustifolia* Rosc.

4.3.4.3 Variabel Kontrol

Pada penelitian ini variabel kontrolnya adalah medium biakan, temperatur 37⁰ C dan lama inkubasi 18-24 jam.

4.3.5 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
1.	Ekstrak rimpang kunci pepet (<i>Kaempferia agustifolia Rosc.</i>)	Rimpang kunci pepet yang digunakan dalam penelitian diidentifikasi di Materia Medica, Kota Batu dan dilakukan ekstraksi di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang dimaserasi dengan larutan etanol 96% dan diambil filtratnya dengan penyaring kemudian diuapkan dalam rotary evaporator dengan suhu 40°C.		Konsentrasi : 1. 100% (Kontrol Bahan) 2. 50% 3. 25% 4. 12,5% 5. 6,25% 6. 3,125% 7. 1,56% 8. 0,78% 9. 0,39% 10. 0% (Kontrol Jamur)	Kategori: ordinal
2.	Pertumbuhan <i>C. albicans</i>	Pertumbuhan jamur dilihat dengan cara menghitung jumlah koloni		Jumlah koloni jamur pada setiap media agar	Numerik : ratio
	KHM (Kadar Hambat Minimal)	Konsentrasi minimal ekstrak kunci pepet (<i>Kaempferia angustifolia rosc.</i>) yang mampu menghambat pertumbuhan jamur <i>C. albicans</i> yang ditandai dengan kejernihan dalam tabung (tidak terdapat	visual	1. Jernih : apabila tidak terdapat endapan putih didasar tabung 2. Agak keruh : apabila dibandingkan dengan kontrol jamur, endapan putih didasar tabung sudah berkurang namun belum sejernih kontrol bahan.	Kategori : Ordinal

		endapan putih pada <i>microplate</i>)		3. Keruh : apabila didapatkan endapan putih yang sama dengan kontrol jamur	
	KBM (Kadar Bunuh Minimal)	Konsentrasi minimal ekstrak kunci pepet (<i>Kaempferia angustifolia rosc.</i>) yang dapat membunuh jamur hingga 99,9% dari inokulum asal pada <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA).	<i>Colony counter</i>	Tidak adanya jamur atau maksimal 0,1% dari kontrol bahan yang dihitung dengan <i>colony counter</i>	Numerik : ratio

4.4 Instrumen Penelitian

4.4.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kunci Pepet

A. Alat

1. Blender
2. Kertas saring
3. Tabung ekstraktor
4. Labu destilasi
5. Pendingin spiral
6. Vacuum
7. *Water pump*
8. Evaporator
9. Bak untuk menampung aquades
10. Selang plastik
11. Cawan

12. Oven

13. Neraca Analitik

14. Ayakan mesh

B. Bahan

1. Rimpang kunci pepet

2. Etanol 96%

3. Aquades

4.4.2 Alat dan Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Kunci Pepet

A. Alat

1. Tabung reaksi steril

2. Ose lengkung

3. Mikropipet 0,1 ml

4. Inkubator

5. Vortex

6. *Colony counter*

7. *Original minoculum*

8. Lampu spirtus

9. Label

10. Spektrofotometer

B. Bahan

1. Perbenihan cair jamur *C. albicans*

2. Ekstrak rimpang kunci pepet

3. Aquades

4. Alumunium foil

5. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)

6. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

4.4.3 Alat dan Bahan Pembuatan *Sabourad Dextrose Agar* (SDA)

A. Alat

1. Labu Erlenmeyer

2. Autoklaf

3. Neraca

4. Cawan petri

B. Bahan

1. Aquades

2. Bahan SDA

4.4.4 Alat dan Bahan Pembuatan *Sabourad Dextrose Broth* (SDB)

A. Alat

1. Labu Erlenmeyer

2. Autoklaf

3. Neraca

4. Tabung reaksi

B. Bahan

1. Aquades

2. Bahan SDB

4.4.5 Alat dan Bahan Pembuatan Perbenihan Cair

A. Alat

1. Ose

2. Tabung reaksi

3. Vortex

B. Bahan

1. NaCl fisiologis

2. Hasil peremajaan biakan jamur *C. albicans*

3. Larutan Mc Farland I

4. Larutan SDB

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan:

1. Mencuci semua alat dengan sabun hingga bersih dan membiarkannya hingga kering.
2. Alat-alat yang bisa disterilisasi dalam autoklaf dibungkus dengan kertas dan dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm, selama 15 menit. Sedangkan alat-alat yang tidak bisa disterilisasi dengan autoklaf disterilkan dengan alkohol 70% selama 20 menit (Andriani, 2016).

4.5.2 Pembuatan Ekstrak Rimpang Kunci Pepet

- a. Rimpang kunci pepet kering yang didapatkan dari material medica Batu sebanyak 0,5 kg dihaluskan dengan blender sampai halus.
- b. Serbuk kering rimpang kunci pepet dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1 liter (seluruh serbuk harus terendam secara keseluruhan). Kemudian kocok selama 30 menit dan diendapkan dalam 24 jam. Hasil yang didapat kemudian dilakukan penyaringan

dengan menggunakan corong sehingga diperoleh ampas dan filtrat pertama.

- c. Ampas pertama dilakukan remaserasi dilarutkan kembali dengan pelarut etanol 96%. Hasil yang didapat kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong sehingga diperoleh ampas dan filtrat kedua.
 - d. Ampas kedua dilarutkan kembali dengan pelarut etanol 96%, kemudian dikocok selama 30 menit dan diamkan selama 24 jam. Hasil yang didapat kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong sehingga diperoleh ampas dan filtrat ketiga.
 - e. Ketiga filtrat digabung dan diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 70°C selama sekitar 1,5 jam hingga diperoleh ekstrak kental. Didapatkan ekstrak sebanyak 20 ml.
 - f. Ekstrak kental dituang kedalam cawan porselin kemudian dipanaskan dengan *water bath* dengan suhu 70°C.
 - g. Ekstrak yang diperoleh diencerkan dengan aquades sehingga konsentrasi mencapai 100% (Kontrol Bahan), 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0% (Kontrol Jamur).
- (Widayat, et al., 2015)

4.5.3 Pembuatan Medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

- a. Menimbang *Sabouraud Dextrose Agar Base* sebanyak kebutuhan, lalu tambahkan aquades sesuai kebutuhan.
- b. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) direbus lalu disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 20 ml (Setyarini et al, 2011).

4.5.4 Pembuatan Medium *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)

- a. Timbang bahan sebanyak kebutuhan, lalu tambahkan aquades sesuai kebutuhan dan diaduk secara merata.
- b. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) direbus sampai tercampur rata.
- c. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) yang sudah direbus disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- d. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing tabung.

4.5.5 Identifikasi *Candida albicans*

Untuk memastikan bahwa koloni yang tumbuh adalah *C. albicans*, dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.

a. Pemeriksaan secara makroskopis

Pemeriksaan ini dilakukan dengan mengamati koloni *C. albicans* yang berupa koloni halus berwarna putih kekuningan dan berbau ragi.

b. Pemeriksaan secara mikroskopis

Pada pemeriksaan ini dilakukan *Germinating tube test*, yaitu dengan cara:

1. Ambil pembenihan *C. albicans* dengan ose dan masukkan kedalam tabung yang berisi serum mamalia.
2. Inkubasikan pada 37°C selama \pm 4 jam.

3. Ambil kultur di dalam serum tersebut menggunakan ose dan letakkan pada gelas obyek, tutup dengan gelas penutup. Periksa di bawah mikroskop menggunakan lensa obyektif perbesaran 40x.
4. Carilah bentukan khas *C. albicans* yaitu bentuk sel yeast dengan *pseudohypha*.

4.5.6 Pembuatan Perbenihan Cair Jamur

Ambil 1 ose koloni jamur dari media subkultur, kemudian suspensikan kedalam SDB didalam tabung. Tabung kemudian divortex dan disesuaikan dengan standart McFarland 1×10^8 CFU/ml.

4.5.7 Uji Kepekaan Ekstrak Rimpang Kunci Pepet terhadap *Candida albicans*

Metode yang digunakan untuk tes ini adalah metode mikrodilusi. Pada penelitian ini diperlukan konsentrasi beberapa macam ekstrak rimpang kunci pepet untuk dicampurkan atau di inokulasikan dengan perbenihan cair jamur *C. albicans* kedalam *microplate*. Proses selanjutnya ialah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dengan cara sebagai berikut :

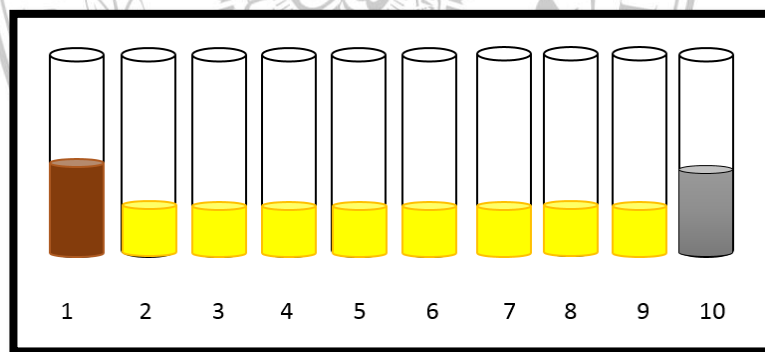
Hari ke-1 :

- a. Menyediakan 1 plate mikrodilusi (*microplate*) (10 tabung steril : tabung 1 (kontrol bahan), tabung 2, tabung 3, tabung 4, tabung 5, tabung 6, tabung 7, tabung 8, tabung 9, tabung 10 (kontrol jamur)).



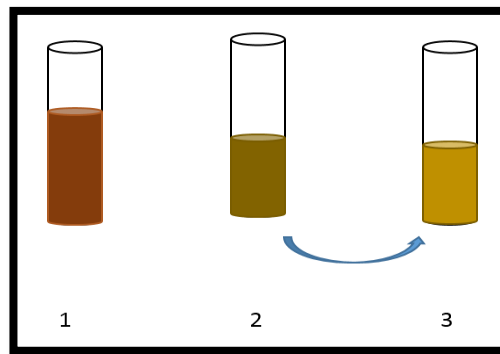
Gambar 4.1 *Microplate*

- b. Memasukkan 0,1 ml aquadest pada tabung 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 0,2 ml ekstrak rimpang kunci pepet pada tabung 1 serta 0,1 ml perbenihan cair jamur *C. albicans* pada tabung 10.



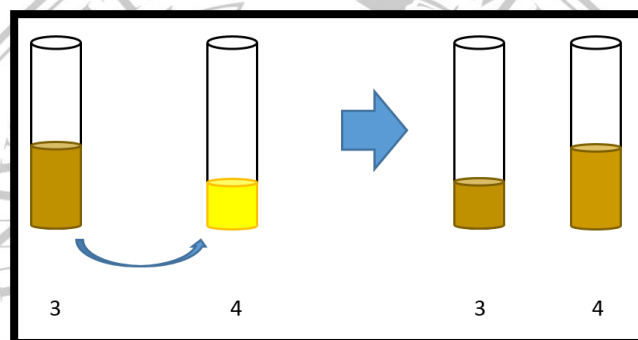
Gambar 4.2 Penuangan ekstrak, aquades dan suspensi cair jamur *C. albicans* pada *microplate*

- c. Memasukkan 0,1 ml ekstrak ke dalam tabung 2 kemudian mengocoknya dengan rata kemudian memasukan 0,1 ml ke tabung 3.



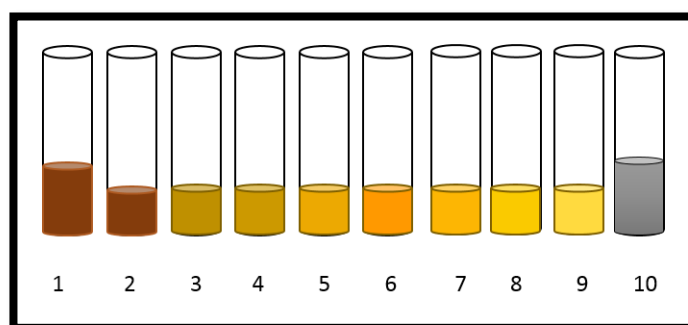
Gambar 4.3 Memasukkan ekstrak ke tabung 2 dan 3

- d. Mencampur hingga rata aquadest dengan ekstrak kunci pepet pada tabung 3, kemudian pindahkan 0,1 ml ke dalam tabung 4.



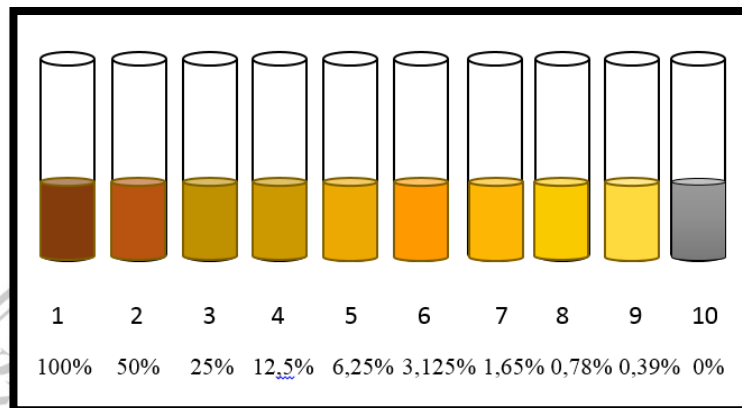
Gambar 4.4 Memindahkan sebagian larutan ke tabung selanjutnya

- e. Melakukan hal yang sama terhadap tabung 5, 6, 7, 8, dan 9.
f. Pada tabung 9 setelah larutan tercampur rata dibuang 0,1 ml.
g. Dari pengenceran diatas, maka konsentrasi awal antifungi dari masing–masing tabung adalah :



Gambar 4.5 Konsentrasi ekstrak kunci pepet setelah pengenceran

- h. Setelah itu tabung 2 sampai 9 ditambahkan perbenihan cair jamur 0,1 ml.
- i. Dengan demikian, volume masing – masing tabung menjadi 0,2 ml sehingga konsentrasi akhir antifungi berubah seperti berikut ini :



Gambar 4.6 Konsentrasi ekstrak kunci pepet setelah ditambahkan jamur *C. albicans* pada mikropate

Kemudian semua tabung diinkubasikan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Hari ke-2 :

Pada hari ke-2 tabung dikeluarkan dari inkubator, akan didapatkan KHM dengan cara melihat kejernihan tabung (endapan putih pada dasar tabung). Kemudian dari masing-masing tabung diambil 1 ose (1 mikroliter) dan dilakukan streaking pada media SDA . Kemudian diinkubasikan lagi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

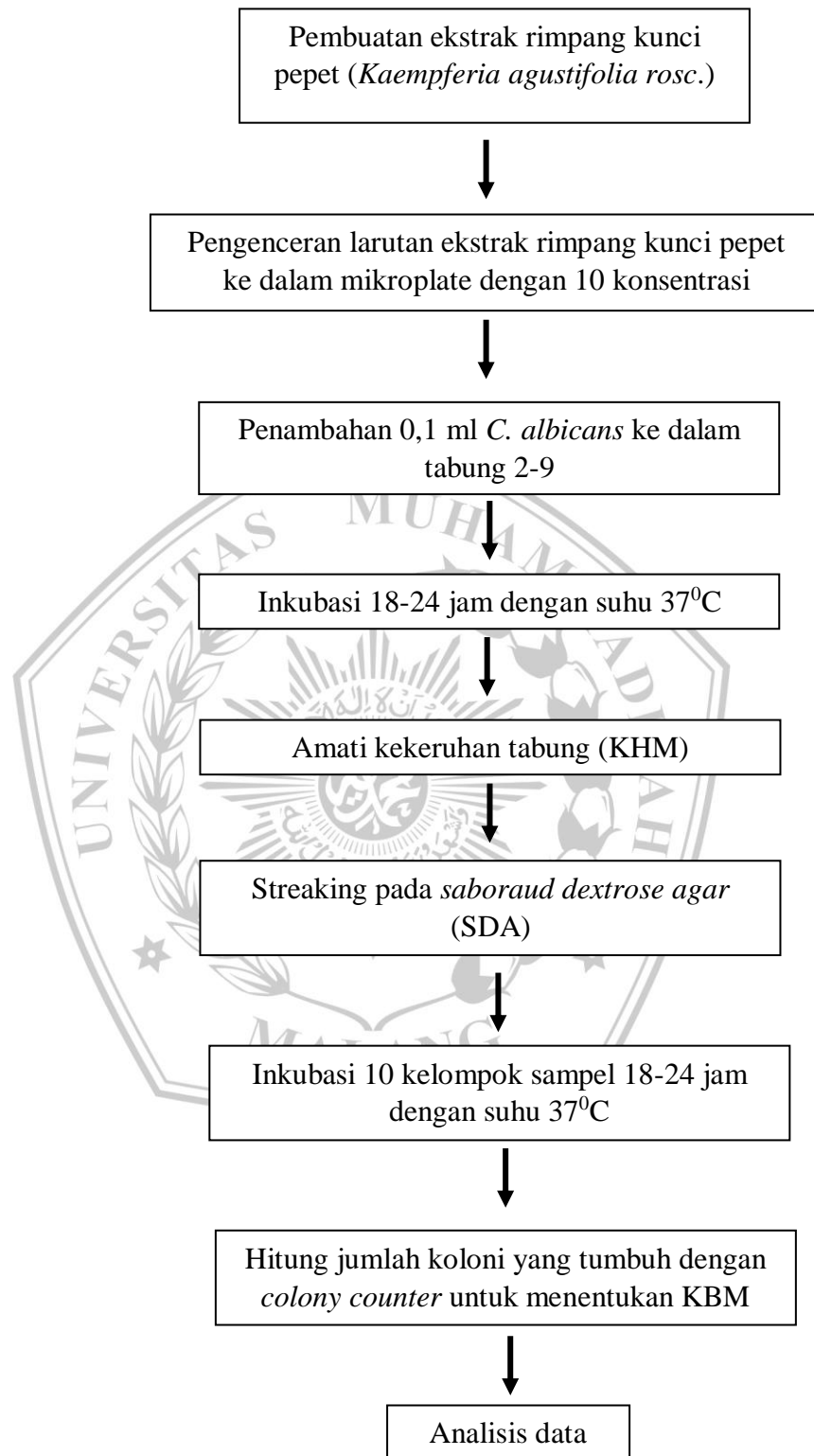
Hari ke-3 :

Media SDA dikeluarkan dari inkubator kemudian dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni jamur dengan *colony counter* sehingga

didapatkan data jumlah. Dan ditentukan KBM nya dengan cara menentukan penurunan 99,9% dari kontrol kuman.



4.5.8 Alur Penelitian



Gambar 4.7 Skema Alur Penelitian Dilusi Tabung

4.6 Metode Analisis Data

Pada penelitian ini untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) konsentrasi ekstrak rimpang kunci pepet (*Kaempferia angustifolia rosc.*) terhadap *C. albicans* yaitu menggunakan analisis deskriptif. Sedangkan untuk menentukan pengaruhnya diperlukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Apabila sebaran data normal digunakan uji *One Way ANOVA*, lalu uji *Post hoc Bonferroni*, dilanjutkan dengan uji *Regresi Linier*.

- a. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Saphiro-Wilk* karena besar sampel yang digunakan ≤ 50 . Data dianggap normal jika hasil $p > 0,05$. Jika hasil $p < 0,05$ maka data dapat ditransformasi dan apabila setelah ditransformasikan data tetap tidak normal maka menggunakan uji *Kruskall Wallis* dan *Post Hoc Mann Whitney U*.
- b. Uji homogenitas yang digunakan paada penelitian ini adalah uji *Levene*. Jika nilai $p > 0,05$ maka ragam dikatakan homogen, begitu pula sebaliknya jika nilai $p < 0,05$ maka ragam dikatakan tidak homogen.
- c. Bila uji normalitas dan uji homogenitas didapatkan sebaran data normal dan varian sama, maka akan dilanjutkan Uji *one way ANOVA* untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol dengan perlakuan. Hasil uji dikatakan ada perbedaan yang bermakna jika $p < 0,05$.
- d. Bila didapatkan sebaran normal dan varian sama, setelah uji *one way anova* dilakukan uji *post hoc Bonferroni*, namun jika didapatkan varian berbeda, setelah uji *one way ANOVA* dilakukan tes uji *post hoc Games Howell*.

e. Uji regresi linier. Pada penelitian ini dilakukan uji regresi linier untuk melihat pengaruh perlakuan pada pertumbuhan jamur. Dikatakan adanya pengaruh jika nilai signifikansi $< 0,05$. Uji regresi linier digunakan untuk melihat seberapa besar pengaruh dengan melihat R^2 (*R Square*) pada output SPSS. Untuk memprediksi pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan persamaan regresi linier sederhana yaitu $Y = a + bX$, dimana Y adalah variabel tergantung, X adalah variabel bebas, a adalah angka konstan dan b adalah angka koefisien regresi.

